

流式细胞分选仪的日常维护

丁宇波, 俞珺璟, 王雪冬, 汤荣蓉, 边玮*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心 (生物化学与细胞生物学研究所), 上海 200031)

摘要: 大型仪器共享平台除提供技术支持外, 对仪器开展必要的日常维护也是重要的工作内容之一。细胞分析技术平台作为中国科学院分子细胞科学卓越创新中心重要的公共技术部门, 拥有多台不同型号的流式细胞仪, 服务中心及周边在流式方面的实验需求, 在仪器使用、管理、维护保养等方面具备丰富的经验。在此以流式细胞分选仪为例, 平台从仪器的环境维护、开关机维护、日常清洗、无菌管路制备、仪器质控及无菌检测等方面详细介绍了流式细胞分选仪日常维护的细节、关键点及难点, 并且给出了详细的潜在故障排除的方案, 以保证此类设备高效正常的运行。

关键词: 流式细胞分选仪; 细胞分选; 日常维护; 公共平台

中图分类号: Q-337

文献标识码:

Routine maintenance of cell sorter

Ding Yubo, Yujunjing, Wangxuedong, Tang Rongrong, Bianwei

(Center for Excellence in Molecular Cell Science, CAS, Shanghai 200031, China)

Abstract: In addition to providing technical support, the core facility also carry out necessary routine maintenance of instruments as one of the important work contents. As an important core facility of Center for Excellence in Molecular Cell Science, CAS, the Cell Analysis Technology Core Facility has a number of different models of flow cytometry, and has rich experience in the use, management and maintenance of instruments. Taking the flow cell sorter as an example, the core facility introduces in details of key points and difficulties of the flow cell sorter's daily maintenance from the aspects of the instrument's environmental maintenance, on-off maintenance, daily cleaning maintenance, sterile pipeline preparation, instrument quality control and sterile testing, and gives detailed potential troubleshooting schemes to ensure the efficient and normal operation of such equipment.

Keywords: Flow cytometer; Cell sorting; Routine maintenance; Core Facility

流式细胞术是一种对快速直线流动状态中的单列细胞或生物颗粒等进行逐个、多参数、快速的定性定量分析或分选的技术，具有检测速度快、测量参数多、采集数据量大、分析信息全面、分选纯度高、方法灵活等特点，被广泛地应用于众多生命科学研究和临床医学领域。流式细胞仪则是以流式细胞术为核心技术，集光学、流体力学、细胞生物学、免疫学以及激光和计算机等多门学科和技术为一体的精密科学技术设备。这类大型仪器高效正常地运行离不开日常的维护保养工作。细致规范的维护工作，可以保证设备处于良好的工作状态，匹配用户使用需求，确保得出的实验结果真实可靠。通过日常维护，可以及时发现并排除潜在的隐性故障，预防设备故障的发生，降低故障率，保障仪器在安全的状态下使用，提高工作效率，并延长设备的使用寿命。这里以 BD FACSAria™ III 系列流式细胞分选仪为例，结合平台的具体实践，梳理流式细胞仪的日常维护工作，包括：开关机操作、日常维护保养以及仪器的质控操作等。

1 流式细胞分选仪放置环境的维护

为保障流式仪的稳定运行，实验室必须维持适宜的温湿度条件。温度和湿度的大幅变化，均会影响激光器的工作效率和流式仪液流的稳定性等。需要通过空调和除湿机常开，来将环境温度控制到 25°C 左右，湿度控制在 30-60% 的范围内。另外，环境中的灰尘等微粒，不仅是分选实验中潜在的污染源，还会干扰光路并妨碍仪器散热。因此，在常规的实验室清扫消毒的基础上，还必须时常检查仪器散热口的空气过滤网，及时清理除尘。仪器间可配备紫外灯，在仪器使用前及使用后进行 15 分钟的照射消毒，确保环境的相对无菌状态。

2 流式细胞分选仪的开机调试流程

2.1 日常清洁与检查

1) 用棉签蘸水擦拭分选仓、收集仓、上样仓等的表面，擦除盐结晶；再用 75% 酒精擦拭消毒；用无尘纸擦干所有湿的表面，同时检查防止棉絮、纸屑等掉入仪器内部如废液抽吸槽里。

盐结晶等杂质的存在可能影响液流稳定性和高压板加电。如图 1 所示，擦拭分选仓时注意仓内的各个表面、高压偏转板、废液抽吸槽、分选仓四周以及仓门，都必须保持清洁。通过点击侧液流窗口中的废液槽（Waste Drawer）可以切换废液抽吸槽的位置，对其内外部进行清洁；当废液槽堵塞严重或者抽拉切换不顺畅时，可以将其拆下冲洗并超声，并对废液槽

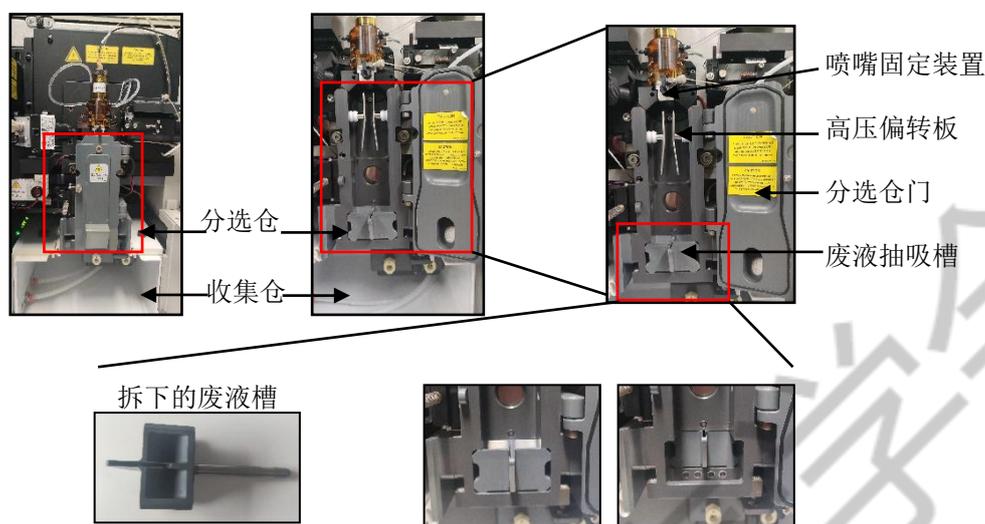


图 1 流式细胞分选仪分选仓的日常清洁

周围进行深度清洁。

擦拭上样仓时，如图 2 所示，注意仓内的各个表面、上样底座和上样仓密封圈都必须保持清洁。上样底座和密封圈上的盐结晶和杂质，可能影响上样仓的密封性，导致进样速度不稳甚至无信号。如发现密封圈磨损，及时更换新的。清洁密封圈后，需要用配件包中的润滑

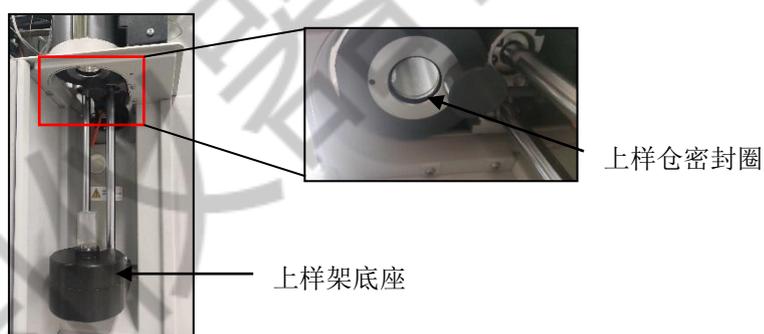


图 2 流式细胞分选仪上样仓的日常清洁

密封油涂抹密封圈表面，确保密封性。

2) 检查鞘液桶和废液桶，确认加满鞘液和清空废液，将鞘液桶的气路与液路分别连接好。其间，检查鞘液桶、酒精关机桶以及废液桶各处的快速接头，确认接头处的密封圈完好无磨损。密封圈磨损引起管路漏气、漏液，会导致系统压力不稳，细胞仪无法正常稳定运行。如图 3 所示，鞘液桶上的气路及鞘液过滤器连接液路的接头由于经常插拔，较易出现磨损。建议每次插拔都注意检查，一旦发现磨损，及时用仪器配套的保养包里的配件进行更换。



图 3 鞘液桶上的液路、气路和鞘液过滤器上的液路接头

2.2 液流启动

启动细胞仪及软件，等待设备加压稳定后，检查液流车左侧的压力表，确认压力在 90 ± 5 psi 的范围内。软件的细胞仪 (Cytometer) 菜单中，点击液流启动 (Fluidics Startup)，按向导提示操作。液流启动过程中，细胞仪内的液路被鞘液充满，并排出流动室、进样针等的气泡。期间，检查鞘液过滤器中是否有气泡，如有，小心地打开过滤器上的螺旋阀门排出气泡；超声清洗实验中所要用到的喷嘴，超声 3 次，每次换清水超 2 分钟，可使用体式镜观察确认喷嘴未堵塞并且密封圈完好。根据提示，取下闭合喷嘴换上实验用喷嘴，完成液流启动流程。

注意：用超纯水清洗闭合喷嘴表面，吸干残留水渍后再收起闭合喷嘴；安装实验用喷嘴前，需清洁喷嘴固定装置 (如图 4 所示)，避免盐结晶等的存在影响喷嘴的精细定位和振荡，

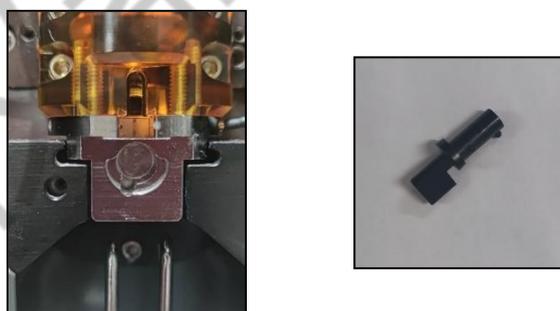


图 4 位于流动室下方的喷嘴固定装置，右图示取下的固定旋钮

导致实验中液流不稳。

2.3 液流调试

完成液流启动流程后，在软件的分选 (Sort) 菜单中选择分选设置 (Sort Setup) 选项，

确认设置的模式与喷嘴的口径相匹配；如需要，在细胞仪（Cytometer）菜单中点击设置（View Configuration），在弹出的窗口中选择合适的设置。确认后，在主液流窗口中开启液流。

等待约 20 分钟，激光器完成预热且设备运行压力稳定，管路里可能残留酒精关机液和小气泡等被排出。期间，可以上样漂白清洗液（BDClean）和无菌水冲洗进样管路。在主液流窗口中，通过微调振幅（Ampl）和频率（Freq）使液流稳定，具体表现为：主液流窗口中，液流断点（Drop 1）和 Gap 值稳定，卫星点（Satellite drop）融入主液滴位置合适且少于 5 滴；侧液流窗口中，点击电压（Voltage），电极板加压，观察主液流和侧液流的亮点，亮点稳定不散。

通常，在环境温湿度保持良好的状态下，同一喷嘴在同一台仪器下的液流设置相对恒定，仅仅微调振幅（Ampl），就可以完成液流调试。如果发现振幅、频率、断点等相关参数都发生很大变化，且调试液流无法稳定，建议进行以下排查：

1)检查鞘液桶是否盖好，各管路是否连接好，排除漏气或管路缠绕等，必要时更换接头密封圈，并重做液流启动流程；

2)检查鞘液过滤器中是否有气泡，并将其排除；

3)检查喷嘴，超声清洗，确保喷嘴上的小孔干净通畅，在体视镜下，观察喷嘴，确认密封圈完好，如磨损则需更换喷嘴；

4)检查喷嘴固定装置，确认喷嘴放置正确；

5)检查流动室，取下喷嘴后开启液流冲洗约半分钟，再运行清洗流动室，排除流动室内的气泡和污渍等。

2.4 光路质控测试

待液流及激光器稳定后，用标准微球进行光路质控测试，确定激光延迟准确、光路聚焦稳定、光电倍增管转换的线性和稳定性等，为获取的数据的可靠性及可重复性提供保障。常用的光路质控测试包括：

1)调用软件中的仪器设置和追踪(CS&T)功能，使用仪器配套的 CS&T 标准微球，自动进行仪器的基线（baseline）测试和仪器状态（performance test）测试。

通常在设备新装机、大修或长时间的定期维护（一般是半年）后，进行基线（baseline）设置，优化设置，并对仪器的灵敏度和荧光分辨率等进行评估；在运行管路无菌大清洗、光路调试等后，进行仪器状态（performance test）测试，评估光路聚焦情况、激光延迟（laserdelay）以及激光和光电倍增管的稳定性等。

图 5 所示为基线测试报告的一部分，设定了各个通道的基线电压（PMTV），并测定仪器的灵敏度（Qr）、背景噪音（Br）、光电转换的线性范围（Linearity Min, Linearity Max）等等。建议在仪器性能处于最佳状态时，进行基线测试，设置基准。

Laser	Detector	Parameter	PMTV	New Target Value	Old Target Value	Bright Bead % Rebutout CV	Med Bead Median Channel	Med Bead % Rebutout CV	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Rebutout CV
Blue	FSC	FSC	473	125000	125000	2.28	12813	2.31	18700	4.56
Blue	C	SSC	244	125000	125000	4.09	121015	4.13	56107	3.18
Blue	B	FTTC	562	26613	24601	2.69	588	12.68	101	38.12
Blue	A	PerCP-Cy5-5	618	20510	27270	3.44	604	17.55	112	49.85
Red	C	APC	500	17133	17021	3.35	507	12.29	97	32.79
Red	B	Alena Fluor 700	449	9548	21576	4.28	339	10.21	78	30.00
Red	A	APC-Cy7	483	11529	22813	4.83	411	12.47	102	31.00
355 UV	B	UV2	461	4478	N/A	3.53	540	5.19	54	26.42
355 UV	A	UV1	626	16669	5	9.29	534	21.16	60	82.81
561 Yellow-Green	E	PE	479	10577	9701	2.52	341	9.36	89	25.20
561 Yellow-Green	D	PE-Texas Red	514	18030	17953	2.84	414	14.47	88	36.94
561 Yellow-Green	C	PE-Cy5	662	14939	21003	3.90	491	19.52	105	50.26
561 Yellow-Green	B	PE-Cy5-5	427	10144	18543	3.19	370	9.00	86	38.25
561 Yellow-Green	A	PE-Cy7	467	19838	21735	3.88	347	11.49	86	29.34

Laser	Detector	Parameter	Linearity Min Channel	Linearity Max Channel	Slope	Intercept	Electronic Noise Rebutout SD	Qr	Br
Blue	FSC	FSC	N/A	N/A	0.0016	3.2	N/A	N/A	N/A
Blue	C	SSC	N/A	N/A	6.5452	-16.8	N/A	N/A	N/A
Blue	B	FTTC	161	23634	7.5573	-18.6	10.1	0.1240	71
Blue	A	PerCP-Cy5-5	53	23232	7.6696	-17.1	11.4	0.0616	72
Red	C	APC	98	23896	7.5030	-16.0	9.7	0.1526	42
Red	B	Alena Fluor 700	422	23974	7.5683	-16.1	8.3	0.1997	187
Red	A	APC-Cy7	480	24120	7.6547	-16.5	5.7	0.2371	110
355 UV	B	UV2	13	23769	7.5185	-16.4	5.6	1.9175	278
355 UV	A	UV1	87	24637	7.7928	-17.6	5.9	0.0584	80
561 Yellow-Green	E	PE	71	23645	7.5833	-16.3	9.3	0.5480	141

Laser	Detector	Parameter	Delay (Trigger on FSC)	Delay (Trigger on Fluorescence)	Area Scaling Factor
Red	01		-79.51	-79.58	0.93
561 Yellow-Green	01		-60.86	-60.30	0.90
Blue	01		0.00	0.00	0.97
355 UV	01		37.83	38.21	0.94

图 5 典型的 CS&T 基线测试报告

而日常的仪器状态测试，报告如图 6 所示，除了常规的激光延迟设置外，还通过与基准值的比较（Target Value, ΔPMTV），追踪监控仪器性能的变化。

Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference Target Value	Bright Bead % Rebutout CV	Med Bead Median Channel	Med Bead % Rebutout CV
Blue	FSC	FSC	150000	152553	0	2.55	125204	2.77
Blue	C	SSC	150000	132498	-3	3.75	123994	3.89
Blue	B	FTTC	26464	26005	-2	2.58	517	12.82
Blue	A	PerCP-Cy5-5	23794	23833	0	3.50	605	18.05
Red	C	APC	12407	12019	-4	3.56	335	13.73
Red	B	Alena Fluor 700	12082	11879	-2	3.30	369	11.38
Red	A	APC-Cy7	12346	12716	5	4.05	339	14.86
355 UV	B	UV2	3726	3630	-3	3.82	434	5.17
355 UV	A	UV1	15292	14847	-3	8.21	498	22.17
561 Yellow-Green	E	PE	10817	10416	-4	2.77	302	10.73
561 Yellow-Green	D	PE-Texas Red	17077	16515	-4	3.11	347	16.36
561 Yellow-Green	C	PE-Cy5	16462	16763	1	4.21	499	22.73
561 Yellow-Green	B	PE-Cy5-5	12855	12280	-4	3.11	336	10.49
561 Yellow-Green	A	PE-Cy7	14162	13561	-5	3.59	312	14.49

Laser	Detector	Parameter	Dim Bead Median Channel	Dim Bead % Rebutout CV	PMTV	Δ PMTV	Qr	Br	PFF
Blue	FSC	FSC	18394	5.53	270	3	N/A	N/A	Pass
Blue	C	SSC	55747	3.00	240	0	N/A	N/A	Pass
Blue	B	FTTC	93	26.35	584	+1	0.1410	75	Pass
Blue	A	PerCP-Cy5-5	110	56.65	633	1	0.0569	56	Pass
Red	C	APC	67	35.79	583	-2	0.1850	30	Pass
Red	B	Alena Fluor 700	75	27.51	478	0	0.3500	52	Pass
Red	A	APC-Cy7	80	35.64	502	-2	0.1990	69	Pass
355 UV	B	UV2	49	34.87	447	-2	1.8351	181	Pass
355 UV	A	UV1	56	74.13	639	-2	0.0541	35	Pass
561 Yellow-Green	E	PE	79	26.42	502	-2	0.3894	63	Pass

图 6 典型的 CS&T 仪器状态测试报告

2)用 Rainbow 微球进行日常质控

日常工作中，可以选用 Rainbow 单峰微球作为标准品上样。以设备性能良好时，比如工程师完成光路调试并运行 CS&T 测试通过时的参数设置和检测结果作为基准；每日开机后，在相同的实验设置下进行流式检测，简要结果如图 7 所示。通过 Rainbow 单峰微球的检测，可以确定激光延迟、面积因子，并将各激光器对应检测通道的荧光测定值 MFI 与之

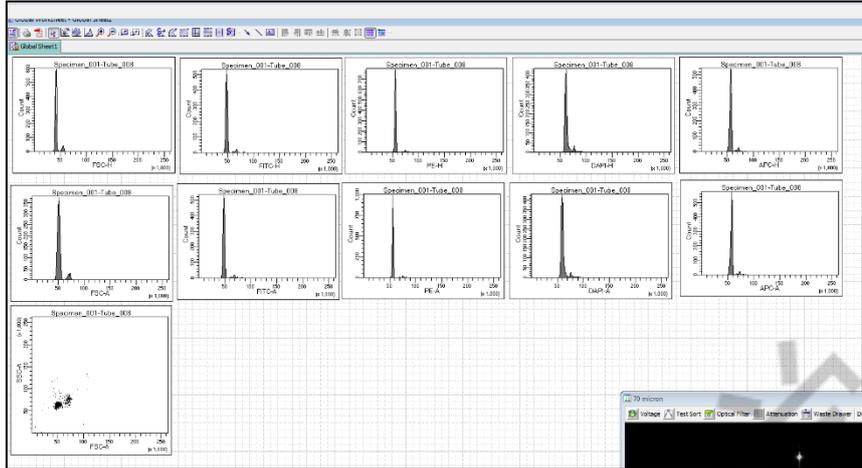


图 7 Rainbow 标准微球的日常检测结果

前测定的基准值进行比较，对设备性能进行测试追踪。

3) 质控结果的分析排查

通常，每日光路测试的结果相对稳定，如果突然发生巨大变化时必须及时排查：

(1) 注意微球的保质期和储存环境，重新配制新的微球样品并充分混匀后，低流速（流速 1）上样，观察检测效果；

(2) 鞘液桶、管路以及上样仓是否存在漏气，必要时更换密封圈；

(3) 进样管路和喷嘴是否有堵塞，清洗排除，必要时更换进样管路及软管；

(4) 流动室是否清洁无气泡，冲洗浸泡流动室；

(5) 如同一激光器对应的检测通道，均没有信号，检查该激光器是否有光束发出，必要时手动重启该激光器，查看是否激光器故障；如同一激光器对应的所有检测通道的信号均发生减弱偏移，先重设阈值为对应荧光通道，排除激光延迟的设置问题，查看是否发生了光路偏移；如特定检测通道的信号有问题，可以通过检查交换相近波段的滤光片测试，排查滤光片的问题等等。

实践操作中发现，流式分选仪光路测试不通过，大部分的原因在于进样管路不畅通和流动室不清洁。对于平台中的高使用率的分选仪，相应提高设备清洗维护的频次，可以大幅减少这方面光路问题的发生。在排查中如发现激光光路偏移、激光信号变弱、滤光片损坏、光电倍增管故障等可能时，需及时联系工程师，对设备进行检修。

2.5 分选质控调试

流式细胞分选，在检测细胞表型的基础上，通过液流充电、压电晶体的高频振荡使液流稳定断开形成液滴，利用高压电极板实现液滴偏转，使得包含有特定细胞的液滴偏转落入收集装置中，最终完成目的细胞的分选。因此，维持稳定的液流断点，并在准确的时间点给液流加电，对分选至关重要。分选仪开机调试的一个重要步骤就是计算加电时刻即液滴延迟，然后就需要在之后仪器运行的工作周期中监控并微调断点位置，以维持液滴延迟不变，来保

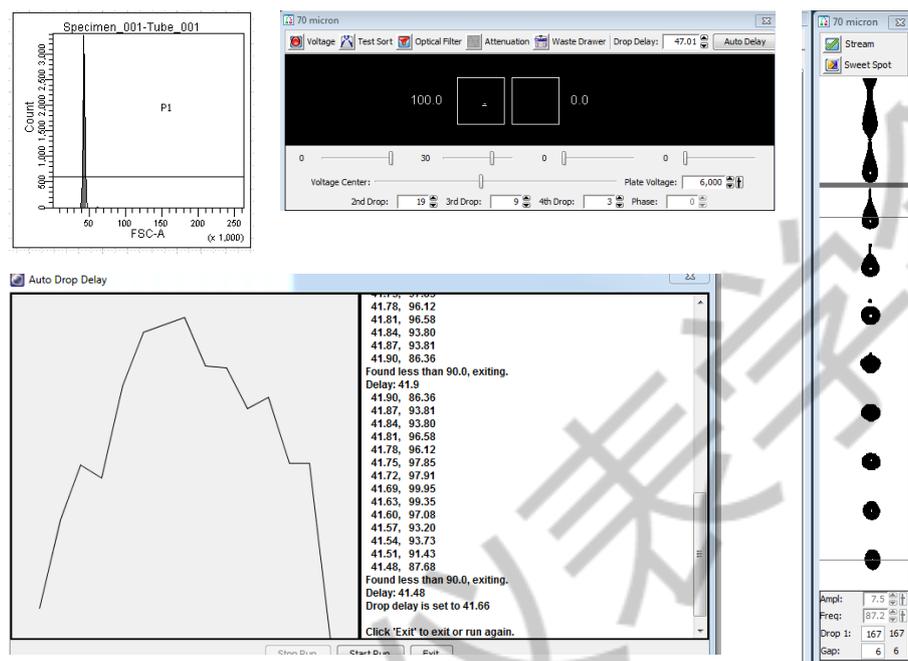


图 8 典型的液滴延迟测试过程

证正确的分选。

开机完成前面的液流准备和检测光路的质控，确定液流稳定后，在主液流窗口开启 Sweet spot 液流实时监控功能，上样 Accudrop 微球进行分选实验，在侧液流窗口中切换滤光片 (Optical Filter)，运行自动延迟计算程序 Autodelay,计算液滴延迟，如图 8 所示。完成后保存分选报告，并做好日志记录。

分选实验中，液流状态可能发生变化，锁定 Sweet spot 液流实时监控功能，会在后台微调振幅 (Ampl) 使液流的断点保持稳定。如果断点变化超过正常范围，会自动暂停分选；待断点回归设定值后继续分选。如果在实验过程中发现分选经常暂停，则提示液流难以维持稳定。这经常是由进样管路和喷嘴堵塞造成的，必须暂停实验，断液流、超声清洗喷嘴后开启液流并清洗进样管路，确认断点位置重新稳定于设定值，再开启液流实时监控功能，之后继续分选实验。分选仪开机后，经历长时程的实验，由于鞘液温度变化等，在液流稳定的状态下断点位置也会发生较大变化，如设备早上开机运行到下午时 Drop 1 实测值可能偏离设

定值 10 以上。这时建议重新设定 Drop 1 值，并测试更新液滴延迟值，确保分选实验的正常开展。

3 流式细胞分选仪的关机维护流程

3.1 管路冲洗：分别用漂白清洗液（BDClean）、去蛋白清洗液（COULTER CLENZ）和无菌水，高速（流速 11）上样，冲洗各 20 分钟。

3.2 废液抽吸槽的清洗：用超纯水清洗分选仓中的废液抽吸槽。实验中鞘液等进入抽吸槽，其结晶可能造成孔洞堵塞，建议每天关机前都用水清理，必要时可以用热水（约 60°C）冲洗。

3.3 关机流程：根据仪器的使用情况，可选择执行日常关机或者液流关机程序。

1) 日常关机流程

- （1）关闭液流，取下喷嘴，换闭合喷嘴；
- （2）清洗流动室：上样一管超纯水，软件的细胞仪（Cytometer）菜单中点击清洗模式（Cleaning Modes），选择清洗流动室（Clean Flow Cell），运行。执行该步骤，用超纯水清洗并浸泡进样针和流动室。为确保流动室充分浸泡清水，需要将管路中的残留的鞘液和气泡排出，建议重复执行 3 次清洗流动室。
- （3）退出应用软件，关闭电脑，关闭细胞仪主机，清空废液桶。

2) 液流关机流程

- （1）关闭液流，取下喷嘴，换闭合喷嘴；
- （2）检查酒精关机桶，并装满 75% 酒精；
- （3）软件的细胞仪（Cytometer）菜单中选择液流关机（Fluidics Shutdown），按提示操作。

注意：通过液流关机流程，细胞仪液路内的鞘液被替换为酒精，可避免盐结晶的形成并确保管路清洁通畅；一般设定计划，每周执行一次即可。由于平台的流式细胞分选仪的使用率都特别高，平台日常都选择运行液流关机流程。另外，针对实验中较多使用核酸染料的设备，建议换用含温和去垢剂的清洗液（浓缩清洗液 Detergent Solution Concentrate (P/N660585)，用超纯水 1:50 稀释后使用），重复执行 3 次清洗流动室，使用去垢剂浸泡过夜，充分清洗进样管路和流动室。

- （4）退出应用软件，关闭电脑，关闭细胞仪主机，清空废液桶。

3.4 喷嘴的清洁

将分选用过的喷嘴用超纯水冲洗，并超声清洗；超声 3 次，每次换清水超 2 分钟；用无尘纸吸干残留水渍后，收藏于干净的试管中保存。

3.5 日常清理

用棉签先后蘸水和酒精，擦拭分选仓、收集仓、上样仓和分选收集架等所有可能溅有鞘液的表面，进行清洁和消毒，并避免盐结晶的形成；再用无尘纸擦干所有湿的表面，同时检查防止棉絮、纸屑等掉入仪器内部如废液抽吸槽里。

4 流式细胞分选仪的日常清洗

4.1 实验中的管路清洗

由于在平台分选的科研人员较多，涉及的样品类型多样并且下游实验目的不同，为了保证实验效果，除了常规的开关机清洗外，必须做好实验间的管路冲洗，确保液流系统清洁通畅。

1) 实验间清洗：清洗进样针，避免进样针中样品或者染料残留。特别是在上机了碘化丙啶 (PI)、DAPI、Hoechst 等核酸染料染色的样品后，必须立即清洁进样针；另外，对于组织消化样品等，有时细胞状态不佳，样品中细胞碎片和死细胞较多，容易黏附在管路上，也建议在完成分选实验后选用含有去蛋白成分的清洗进样针。分选后清洗步骤：

(1) 进样针反冲：软件的细胞仪 (Cytometer) 菜单中点击清洗模式 (Cleaning Modes)，选择样品管路反冲 (Sample Line Backflush)，运行，用鞘液冲洗进样管路，减少样品间的交叉污染；

(2) 流式管中装约 3mL 漂白清洗液 (BDClean)，上样，高速 (流速 11)，冲洗 10 分钟；

(3) 流式管中装约 3mL 去蛋白清洗液 (COULTER CLENZ)，上样，高速 (流速 11)，冲洗 10 分钟；

(4) 流式管中装约 3mL 无菌水，上样，高速 (流速 11)，冲洗 10 分钟。

2) 无菌分选前的管路清洗：

对于分选后要进行细胞培养或者移植等实验时，要求确保分选样品的无菌，相应的无菌分选前清洗步骤：

流式管中装约 3mL 含有青霉素和链霉素的磷酸盐缓冲液 PBS，上样，高速 (流速 11)，冲洗 10 分钟；

必要时可以先用 75% 酒精上样，冲洗管路 5 分钟，之后再缓冲液冲洗。

需要注意的是，酒精上样时，酒精与鞘液混合后会改变鞘液的成分及黏度，影响液流的稳定性，具体表现为主液流窗口中液流断点的剧烈变化，为避免液流中断，建议中速（流速 6）上样，并关闭分选实时监控功能 Sweet Spot 的锁定，完成管路冲洗后在开始分选前打开 Sweet Spot 监控分选流程。

4.2 无菌清洗

为保障无菌分选的质量，根据分选仪的使用量，平台定期对鞘液桶、鞘液管路和样品管路进行清洗消毒，具体包括：

1) 鞘液桶的清洗消毒

分选中使用的鞘液一般为高压灭菌的磷酸盐缓冲液 PBS。为确保鞘液桶的清洁无菌，平台一周左右进行一次鞘液桶的清洗消毒。

- (1) 清空鞘液桶，用 75% 酒精擦拭桶内各表面；
- (2) 加入约 2L 75% 酒精浸润桶内表面后，浸泡过夜；
- (3) 清空鞘液桶内的酒精，用灭菌过的超纯水涮洗桶 3 次，再用鞘液涮洗一次；
- (4) 加满鞘液，正常开机。

注意：清空鞘液桶的过程会导致桶内管路进气，执行开机流程中注意鞘液过滤器排气泡，必要时可连续作两次液流启动流程，确保管路里的气泡充分排出。

2) 管路的无菌清洗

执行软件清洗模式（Cleaning Modes）中的无菌清洗（Prepare for Aseptic Sort），用漂白清洗液（BDClean）、无菌水和 75% 酒精，对完整的鞘液管路和样品管路进行清洗消毒。一般三个月做一次。如图 9 所示，需要用到液流车上的 3 个小塑料桶。

(1) 为保障无菌清洗效果，先对用到的水桶进行清洗消毒：清空水桶，加入约 1L 75% 酒精浸润桶内表面后，浸泡过夜；清空桶内的酒精，用灭菌过的超纯水涮洗水桶 3 次；装入 3L 无菌的超纯水，将小桶放置并连接于液流车上的对应位置；

(2) 漂白清洗液（BDClean）和 75% 酒精也装入相应的小桶，并连接于液流车上的对应位置；



图 9 液流车上用于管路无菌清洗的小桶

(3) 软件细胞仪 (Cytometer) 菜单下, 清洗模式 (Cleaning Modes) 选择无菌分选准备 (Prepare for AsepticSort) 选项, 按照向导提示操作;

(4) 完成管路清洗消毒后, 根据提示, 鞘液管路上更换新的鞘液过滤器并接回鞘液桶。

(5) 无菌大清洗的周期视仪器使用量决定, 一般建议一个月做一次。

3) 无菌测试和污染排查

为了对流式细胞分选仪的无菌状态进行评估, 可以采样不同位置的鞘液加入不含双抗的培养液中 37°C 培养, 观察细菌的生长情况进行排查。

(1) 鞘液桶中的鞘液: 若发现污染, 用 75% 酒精对鞘液桶清洗消毒;

(2) 鞘液过滤器出口处的鞘液: 若发现污染, 在鞘液桶清洗消毒的基础上, 更换新的鞘液过滤器;

(3) 从喷嘴流出的鞘液: 若发现污染, 进行全面的管路的无菌清洗, 其中包含了鞘液桶的清洗消毒和更换鞘液过滤器。

综上所述, 基于日常工作使用经验及问题情况, 我们从仪器的环境维护、开关机维护、日常清洗维护、无菌管路制备、仪器质控及无菌检测等方面详细介绍了流式细胞分选仪日常维护的重点、难点及故障排查点。加强日常管路清洗, 并定期清洗鞘液桶和执行管路无菌清洗可以很好的维持流式细胞分选仪的状态, 保障无菌分选实验的有序开展及保证高质量的实验数据。

参考文献:

[1] 陈朱波, 曹雪涛 《流式细胞术——原理、操作及应用 (第二版)》 科学出版社, 2014

[2] BD FACSAria™ III User's Guide. BD Biosciences. bdbiosciences.com 23-11654-01 Rev.

012012

[3] BD FACSDiva™ Software Reference Manual For Version 8.0. BD Biosciences.

bdbiosciences.com 23-14523-00 2013